

## [症 例]

Vero 毒素と基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) を同時に産生する  
*Escherichia coli* O26 の 1 症例大塚昌信<sup>1)</sup>・吉田美江子<sup>1)</sup>・井澤雅子<sup>2)</sup>・宇野 拓<sup>2)</sup>・山口之利<sup>2)</sup>  
四宮範明<sup>2)</sup>・石井良和<sup>3)</sup>・山口恵三<sup>3)</sup>・橋詰直孝<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 東邦大学医学部附属大橋病院臨床検査部<sup>2)</sup> 東邦大学医学部小児科学第 2 講座<sup>3)</sup> 東邦大学医学部微生物学講座

(平成 16 年 10 月 18 日受付, 平成 16 年 12 月 17 日受理)

Vero 毒素と基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL) を同時に産生する *Escherichia coli* O26 による感染症を経験したので報告する。患者は 9 歳の女児、腹痛および水様性下痢を主訴として 2004 年 6 月 14 日東邦大学医学部附属大橋病院小児科を受診した。同 16 日に提出された便検体から *E. coli* が検出された。O 抗原の型別は O26 であり、Vero 毒素の検査にて VT1 が陽性、VT2 が陰性と判定された。また、本菌株に対する薬剤感受性試験成績から、セフォタキシムに対して 32  $\mu$ g/ml 以上の MIC 値を示した。National Committee for Clinical Laboratory Standards が定めたディスク拡散法で ESBL の確認検査を実施した結果、本菌が ESBL を産生していることが強く示唆された。さらに、PCR 法により  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出を試みたところ、CTX-M-9 が属するグループの特異的プライマーと反応した。本報告は ESBL を産生し、かつ Vero 毒素 (VT1) を産生する *E. coli* O26 感染の第 1 報である。

**Key words:** *Escherichia coli* O26, Vero 毒素, ESBL

*Escherichia coli* は一般的に健常人の腸内細菌叢を構成している菌であるが、敗血症、髄膜炎、食中毒を含む腸管内感染症などさまざまな疾患の原因菌ともなる。Vero 毒素を産生する *E. coli* O26 による腸管出血性大腸菌感染症は O157 に次いで報告例が多い<sup>1)</sup>。*E. coli* O26 は、*E. coli* O157 による感染症と比較すると劇症型を呈することは少ないといわれている<sup>2)</sup>。Vero 毒素 (Shiga 毒素) を見ても、*E. coli* O157 は VT1 (Stx1) および VT2 (Stx2) の両方を産生する菌株が多く分離されるが、*E. coli* O26 では VT1 のみを産生する菌種が多い<sup>3)</sup>。これらの O 抗原を有する *E. coli* は一般に enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC: 腸

管出血性大腸菌) あるいは Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC: 志賀毒素産生大腸菌) と呼ばれており、本菌種が原因と断定された感染症の集団発生も多数報告されている<sup>4), 5)</sup>。

*E. coli* は元来多くの抗菌薬に高い感受性を示す菌種の一つであったが、近年  $\beta$ -ラクタム系薬をはじめアミノ配糖体系薬、フルオロキノロン系薬に耐性菌が出現しており、決して抗菌薬に対して感受性の高い菌種ではなくなっている<sup>6), 7)</sup>。*E. coli* はいわゆる第二世代、第三世代、第四世代に属するセフェム系薬あるいはカルバペネム系薬に対して高い感受性を示していたが、1980 年代に基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL) が発見されると第三世代あるいは第四世代セフェム系薬に耐性を示す *E. coli* が現在では数%にのぼっている<sup>8)</sup>。

ESBL 産生 *Salmonella* は報告されている<sup>9)~11)</sup>が、ESBL 産生 STEC に関する報告はない。今回、ベロ毒素と ESBL を同時に産生する *E. coli* O26 が分離され

著者連絡先: (〒153-8515) 東京都目黒区大橋 2-17-6  
東邦大学医学部附属大橋病院臨床検査部  
大塚昌信  
TEL: 03-3468-1251 内線 3258  
FAX: 03-3468-1706  
E-mail: ohtsuka01@oha.toho-u.ac.jp

た症例を経験したので報告する。

## I. 症 例

患者：9歳，女児。

主訴：水様性下痢，腹痛，微熱，悪心。

既往歴：5歳時に頸部リンパ節炎の診断を受け当院にて通院加療，9歳時に伝染性紅斑の診断を受け当院にて通院加療。

家族歴：特記すべき事項なし。

現病歴：2004年5月17日より伝染性紅斑の治療のため当院小児科に通院開始。同21日に腹痛，軟便を認めていた。6月14日より腹痛，水様性便が出現。排便回数も5～6回/日と増加したため当院小児科再受診した。

受診時検査所見：6月11日に実施していた血液検査では特に異常は認められなかった (Table 1)。また，16日の便については目視では血液の混入は認められなかった。

臨床経過：6月14日，外来にてラクトミン製剤2g，天然ケイ酸アルミニウム1.5g，塩酸ロペラミド0.8gを処方。同16日，細菌検査のため便を採取後，ホスホマイシン (FOM) が処方された。このときの便からVero毒素 (VT1) を産生する *E. coli* O26 が検出された。25日ごろより下痢症状は改善傾向にあったがFOMは継続処方された。その後7月6日および12日に実施した便培養では *E. coli* O26 は検出されず軽快した。

## II. 細菌学的検査

### 1. 分離同定

培地は5%羊血液寒天 (日水製薬)，DHL寒天 (日

水製薬)，TCBS寒天 (極東製薬)，スタヒロコッカス No. 110 (極東製薬) を用い 35℃ 好気条件で，またスキロー改良培地 (栄研化学) を用い 42℃ 微好気条件で培養を行った。約20時間培養後，5%羊血液寒天にオキシダーゼ陰性のグラム陰性桿菌が，DHL寒天上にも乳糖または白糖を分解する菌株が多数発育した。なお，スタヒロコッカス No. 110 はわずかにブドウ球菌の発育を認めたが，TCBS寒天，およびスキロー寒天には培養48時間後も菌の発育は認められなかった。

DHL寒天に発育したコロニーを各種確認用培地に接種・培養した。その結果，TSI培地では，斜面部で乳糖または白糖の分解能が，高層部でブドウ糖の発酵およびガス産生能が確認された。硫化水素の産生能は，TSI培地およびSIM培地で確認されなかった。SIM培地では，本菌はインドール陽性，IPA反応陰性で運動性も有していることが確認された。シモンズクエン酸ナトリウム培地では，クエン酸ナトリウムの利用能は確認されなかった。これらは一般的な *E. coli* の生化学性状と一致した。さらに，MicroScan Neg Combo 5J パネル (DADE BEHRING) を用いた Walk Away SI による同定でも *E. coli* であることが確認された。次に，病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別を実施したところ，本菌のO抗原は26であることが明らかとなった。そこで，VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研) を用いてVero毒素の検出を実施した結果，本菌はVT1陽性，VT2陰性であった。

### 2. 薬剤感受性試験

Neg Combo 5J パネルにて得られた薬剤感受性検査結果を Table 2 に示した。セフトキシムおよびセフピロムのMIC値がそれぞれ32 μg/ml 以上，16 μg/ml 以上であり，ESBL産生株である可能性が示唆された。そこで，National Committee for Clinical Laboratory Standards の方法<sup>12)</sup>に準じたディスク法にてESBL確認検査を実施した。その結果，セフトキシム単独のディスクの阻止円径が14 mm に対してクラブラン酸が配合されたものでは28 mm と明らかな阻止円径の拡張が認められた。さらに，セフポドキシム単剤ディスクによる阻止円径は全く認められなかったのに対して，クラブラン酸が配合されたディスクでは24 mm の阻止円径が認められた。すなわち，いずれの場合も National Committee for Clinical Laboratory Standards による判定基準の「抗菌薬単独とクラブラン酸と配合されたディスク周囲の阻止円径の差が5 mm 以上」であることから本菌株はESBL

Table 1. Laboratory data on admission.

Peripheral blood		Blood chemistry	
RBC	456×10 <sup>4</sup> /μl	TP	7.4 g/dl
Hb	12.9 g/dl	ALB	4.5 g/dl
Ht	39.5%	AST	26 IU/l
		ALT	18 IU/l
WBC	7.9×10 <sup>3</sup> /μl	LDH	594 IU/l
Seg	54.5%	BUN	9 mg/dl
Lym	27.5%	CREA	0.4 mg/dl
Mono	5.5%	Na	141 mmol/l
Eosino	9.0%	K	3.9 mmol/l
Baso	1.0%	Cl	104 mmol/l
		Ca	9.3 mg/dl
Plt	26.4×10 <sup>4</sup> /μl	CPK	99 IU/l
		CRP	0.1 mg/dl

Table 2. Antibiotic susceptibility.

Antibiotics	MIC values ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ampicillin	>16
Piperacillin	>64
Cefaclor	>16
Cefazolin	>16
Cefotiam	>16
Cefmetazole	$\leq 4$
Cefotaxime	>32
Ceftazidime	$\leq 2$
Cefpirome	>16
Aztreonam	$\leq 8$
Flomoxef	$\leq 2$
Imipenem	$\leq 1$
Cefoperazone/sulbactam	$\leq 16/8$
Amikacin	$\leq 4$
Gentamicin	$\leq 1$
Minocycline	$\leq 1$
Fosfomycin	$\leq 4$
Levofloxacin	$\leq 0.5$
Sulfamethoxazole-trimethoprim	$\leq 2/38$

を産生していることが強く示唆された。

### 3. PCR による ESBL 型の推察

本菌株が保有する ESBL の型別は、既報の CTX-M-型のサブグループに特異的な 3 種類のプライマーおよび反応条件を用いたコロニーダイレクト PCR 法<sup>13)</sup>で Thermal Cycler 2400 (Applied Biosystems) を用いて実施した。すなわち、少量の菌株を滅菌爪楊枝で釣菌し、50  $\mu\text{l}$  の PCR 反応液中に懸濁し、95°C 5 分間の DNA の変成反応の後、95°C 3 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒で 40 サイクルの PCR 反応を実施した。なお、PCR 反応液は 50 pmol ずつの TEM-型、SHV-型、Toho-1 (CTX-M-2 グループ)、CTX-M-3、CTX-M-9 に特異的なプライマー<sup>14)</sup>、2.5 unit の Taq DNA polymerase, dNTP を含んでいる。PCR 反応産物は 1.0% アガロースゲルを用い、電気泳動法にて特異的シグナルを検出した。陽性コントロールには TEM-型、SHV-型、Toho-1 (CTX-M-2 グループ)、CTX-M-3、CTX-M-9 産生株を用いた。今回対象とした菌株は CTX-M-9 グループの特異的プライマーセットで増幅された。したがって、今回の菌株が産生する ESBL は CTX-M-9 グループであることが明らかとなった。

### 4. 考 察

3 類感染症である腸管出血性大腸菌感染症の多くは *E. coli* O157 に起因するものであるが、わが国ではこれに次いで報告例の多い血清型が O26 である。また、

2001 年以降 O157 では Vero 毒素として、VT1 および VT2 の両方を産生する菌株が 6~7 割であるのに対して、O26 では VT1 単独が 8 割以上を占めているとされている<sup>15)</sup>。*E. coli* O26 による STEC 感染症の多くは鞭毛抗原型が H11 であるのに対して今回検出された株は H7 であった。また、PCR 法にて *stx1*、*eaeA* および STEC *hlyA* が陽性、*stx2* が陰性であることも確認された<sup>19)</sup>。

腸管出血性大腸菌感染症の臨床経過は個人差があるものの腹痛を伴う水様性下痢を発症し、2~3 病日には鮮血が混じり、重症例では便成分を認めない血性下痢となり腹痛も増強するとされている。さらに、血液検査では発病初期には白血球は増多しても CRP は陰性というのも特徴の一つとされている<sup>5)</sup>。

本症例では便への血液混入が認められなかったことを除けば臨床症状は上記に合致するものであった。なお、6 月 14 日の下痢症状が著明になる前に認めていた 5 月 21 日の腹痛、軟便は一般的な腸管出血性大腸菌の潜伏期間 (長くても 2 週間程度) から考えると発症前の兆候であった可能性は低いと思われた。

一方、ESBL として欧米では TEM-型あるいは SHV-型が主流であるが、日本では 1995 年に Ishii らによって Toho-1 が初めて報告<sup>16)</sup>されて以来、Toho-1 の属する CTX-M-型を産生する菌株が多く分離されている。National Committee for Clinical Laboratory Standards によると、日常検査で検出可能な ESBL の対象菌種は *E. coli*、*Klebsiella pneumoniae* および *Klebsiella oxytoca* とされている<sup>17)</sup>。しかし、*Enterobacter*、*Citrobacter*、*Serratia*、*Morganella*、*Proteus* および *Salmonella* についても ESBL を産生する菌種が報告されている<sup>8)~11)</sup>。ESBL をコードする遺伝子はプラスミド上に存在するため<sup>18)</sup>、菌種を越えて伝播する機会が多いと考えられる。今回分離された菌株の ESBL をコードする遺伝子が存在するプラスミドの接合伝達の頻度は、 $10^{-4}$  程度であることを確認している<sup>19)</sup>。この伝達頻度は決して低いものではなく、このプラスミドを保有する菌株から、別の菌株へと容易に遺伝子が移動する可能性を強く示唆している。今回検出された菌株は、PCR により CTX-M-9 が属するサブグループの遺伝子を保有していることが明らかとなった。本症例の *E. coli* O26 も他の菌種あるいは他の *E. coli* 株から ESBL 産生遺伝子を獲得したと考えられる。

当院では、便由来の *E. coli* が腸管出血性大腸菌の可能性のある血清型を示した場合、疫学的見地から MicroScan Neg Combo 5J パネルにて再同定および

薬剤感受性検査を同時に実施している。腸管出血性大腸菌感染症の治療において、通常 $\beta$ -ラクタム系薬の使用は推奨されていないことから、今回報告したESBL産生STECは治療上の問題は大きくないと考えられる。しかし、感染症治療が経験的に行われることが多いこと、また本菌株の耐性因子が他菌株へ伝達することを考慮すると、STECにおいても院内感染対策上ESBL産生性を確認する意義はあると考えられる。このような耐性菌あるいは耐性因子の拡散防止のために疫学調査が重要であることが再認識された。

## 文 献

- 1) 感染症情報センター. 2004. 病原微生物検出情報 (IASR) 25: 148-150.
- 2) Russo, T. A. 2001. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed. McGraw-Hill Professional, New York.
- 3) Brett, K. N., V. Ramachandran, M. A. Hornitzky, et al. 2003. *stx*<sub>1c</sub> is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. J. Clin. Microbiol. 41: 926-936.
- 4) 川村尚久, 山崎 剛, 柿原昌弘, 仲野 孝, 柴 紘次, 山田義夫, 鎌田武信. 1998. 大阪府堺市における病原性大腸菌O157集団感染に対する緊急対応, 治療経験. 日本災害医学会誌 46: 521-530.
- 5) Hoshina, K., A. Itagaki, R. Seki, et al. 2001. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak caused by contaminated natural water supplied by facility owned by local community. Jpn. J. Infect. Dis. 54: 247-248.
- 6) Jones, R. N., P. R. Rhomberg, D. J. Varnam, et al. 2002. A comparison of the antimicrobial activity of meropenem and selected broad-spectrum antimicrobials tested against multi-drug resistant Gram-negative bacilli including bacteremic *Salmonella* spp.: initial studies for the MYSTIC programme in India. Int. J. Antimicrob. Agents 20: 426-431.
- 7) Ahmed, A. M., T. Shimamoto. 2004. A plasmid-encoded class 1 integron carrying *sat*, a putative phosphoserine phosphatase gene and *aadA2* from enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 isolated in Japan. FEMS Microbiol. Lett. 235: 243-248.
- 8) Spanu, T., F. Luzzaro, M. Perilli, et al. 2002. Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to  $\beta$ -lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 196-202.
- 9) Baraniak, A., E. Sadowy, W. Hryniewicz, et al. 2002. Two different extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in one of the first ESBL-producing *Salmonella* isolates in Poland. J. Clin. Microbiol. 40: 1095-1097.
- 10) AitMhand, R., A. Soukri, N. Moustauoui, et al. 2002. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. J. Antimicrob. Chemother. 49: 169-72.
- 11) Mulvey, M. R., G. Soule, D. Boyd, et al. 2003. Characterization of the first extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. J. Clin. Microbiol. 41: 460-462.
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility; approved standard-Eighth edition, M2-A8. NCCLS, Wayne (PA).
- 13) Tsuchizaki, N., J. Ishikawa, K. Hotta. 2000. Colony PCR for rapid detection of antibiotic resistance genes in MRSA and enterococci. Jpn. J. Antibiot. 53: 422-429.
- 14) 堀口祐司, 橋北義一, 岡 陽子, 高橋 俊, 山崎勉, 前崎繁文, 石井良和. 2004. 臨床材料から分離された cefotaxime 耐性 *Proteus mirabilis* の耐性機構およびその患者背景に関する検討. 感染症学雑誌 78: 1-9.
- 15) 感染症情報センター. 2004. 病原微生物検出情報 (IASR). 25: 138-139.
- 16) Ishii, Y., A., Ohno, H. Taguchi, et al. 1995. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2269-2275.
- 17) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement, M100-S14. NCCLS, Wayne (PA).
- 18) Bush, K., G. A. Jacoby, A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211-1233.
- 19) Ishii, Y., S. Kimura, J. Alba, K. Shiroto, M. Otsuka, N. Hashizume, K. Tamura, K. Yamaguchi. 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Shiga Toxin Gene (*stx*<sub>1</sub>)-positive *Escherichia coli* O26:H11: A new concern. J. Clin. Microbiol. 43: 1072-1075.

## A Case of Vero Toxin and Extended-spectrum $\beta$ -Lactamase Producing *Escherichia coli* O26 Infection

Masanobu Otsuka,<sup>1)</sup> Mieko Yoshida,<sup>1)</sup> Masako Izawa,<sup>2)</sup> Taku Uno,<sup>2)</sup> Yukitoshi Yamaguchi,<sup>2)</sup>  
Noriaki Shinomiya,<sup>2)</sup> Yoshikazu Ishii,<sup>3)</sup> Keizo Yamaguchi,<sup>3)</sup> Naotaka Hashizume<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Laboratory Medicine, Toho University Ohashi Hospital

<sup>2)</sup> Department of Second Pediatrics, Toho University School of Medicine

<sup>3)</sup> Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

We report an infection with *Escherichia coli* O26 which produces Vero toxin and also an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). A nine-years-old girl presented an abdominal pain and water like diarrhea. The patient consulted Department of Pediatrics, Toho University Ohashi Hospital on June 14, 2004. *E. coli* was isolated from the faces sample of this patient on June 16. The type of O antigen of this strain confirmed as O26, and this strain also confirmed VT1 positive, as a Vero toxin. However, this strain produced no VT 2. Moreover, the MIC value of this strain against cefotaxime was more 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or more by antibiotic susceptibility testing. Accordingly, the ESBL confirmatory testing by disk diffusion method was done following the recommendation of the National Committee for Clinical Laboratory Standard performed for this strain. From the results of this test, it is strongly suggested that this strain produces one of the ESBL. The ESBL of this strain was categorized in CTX-M-9 group  $\beta$ -lactamase by PCR analysis using specific primer sets. This is the first report of ESBL and Vero toxin (VT1) producing *E. coli* O26 infection.

**Key words:** *Escherichia coli* O26, Vero toxin, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)